

TRANSLATION OF CERTIFIED DOCUMENT

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF THE APPLICATION AS ORIGINALLY FILED WHICH IS IDENTIFIED HEREUNDER.

APPLICATION DATE: March 28, 2003

APPLICATION NUMBER: 92107128

(TITLE: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PROPHYLAXIS OR TREATMENT OF OSTEOPOROSIS, AND METHOD TO PREPARE THE SAME)

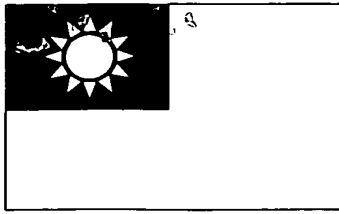
APPLICANT: NuLiv Biomedicine Inc.

DIRECTOR GENERAL

蔡練生

ISSUE DATE: February 19, 2003

SERIAL NUMBER: 09320157700



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 03 月 28 日
Application Date

申請案號：092107128
Application No.

申請人：維京仲華（上海）生物醫藥科技有限公司
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2004 年 2 月 19 日
Issue Date

發文字號：09320157700
Serial No.

申請日期：92. 3. 28	IPC分類
申請案號：92107128	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	用於預防及治療骨質疏鬆症之醫藥組合物與製備方法
	英文	Pharmaceutical composition for treatment of osteoporosis, and method to prepare the same
二、 發明人 (共2人)	姓名 (中文)	1. 宋純清
	姓名 (英文)	1. Song, Chung-Qing
	國籍 (中英文)	1. 中國大陸 CN
	住居所 (中文)	1. 中國上海市浦東新區張江高科技園區碧波路五一八號A一一一室
	住居所 (英文)	1. Suite A111, No. 518 Bibo Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Pudong New District Shanghai, China 201203
三、 申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 維京仲華(上海)生物醫藥科技有限公司
	名稱或姓名 (英文)	1. NuLiv Biomedicine Inc.,
	國籍 (中英文)	1. 中國大陸 CN
	住居所 (營業所) (中文)	1. 中國上海市浦東新區張江高科技園區碧波路五一八號A一一一室 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1. Suite A111, No. 518 Bibo Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Pudong New District Shanghai, China 201203
	代表人 (中文)	1. 王強
代表人 (英文)	1. Hsiang Wang	



申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	
	英文	
二、 發明人 (共2人)	姓名 (中文)	2. 王強
	姓名 (英文)	2. Hsiang Wang
	國籍 (中英文)	2. 中國大陸 CN
	住居所 (中文)	2. 中國上海市浦東新區張江高科技園區碧波路五一八號A一一一室
	住居所 (英文)	2. Suite A111, No. 518 Bibo Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Pudong New District Shanghai, China 201203
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	
	名稱或 姓名 (英文)	
	國籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中文)	
	住居所 (營業所) (英文)	
	代表人 (中文)	
代表人 (英文)		

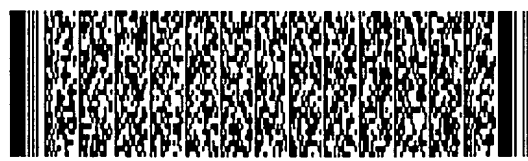


四、中文發明摘要 (發明名稱：用於預防及治療骨質疏鬆症之醫藥組合物與製備方法)

本發明係關於一種用於骨質疏鬆症之醫藥組合物與製備方法，該醫藥組合物係由蛇床子及菟絲子組成，經純化後含香豆素類和黃酮類高含量有效成分的醫藥組合物。利用菟絲子搭配蛇床子所獲得之醫藥組合物，可明顯提高骨礦密度及增加骨灰中的鈣、磷含量，此外本發明亦了降低蛇床子的口服毒性。

六、英文發明摘要 (發明名稱：Pharmaceutical composition for treatment of osteoporosis, and method to prepare the same)

The present invention relates to a pharmaceutical composition for treatment of osteoporosis, which is extracted from a mixture consisting of Fructus cnidii and Semen cuscutae and then purified to obtain large amount of active ingredients, osthole and quercetin. The invention also provides a method of preparation of the pharmaceutical composition.



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先

無

二、主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間

日期：

四、有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。



五、發明說明 (1)

一、【發明所屬之技術領域】

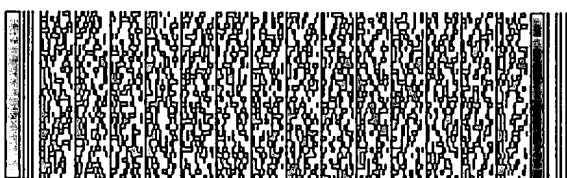
本發明係關於一種用於預防及治療骨質疏鬆症的醫藥組合物及製備方法，尤其是與老年人及/或更年期婦女有關的骨質疏鬆症。

二、【先前技術】

骨質疏鬆症是一種骨組織量減少、骨組織顯微結構改變，骨負載能力減少，骨折危險性增加的全身性疾病。骨質疏鬆症多發生於老年人和停經後的婦女。初期表現為全身疼痛或腰腿痛，後期隨著骨質疏鬆症加劇，引起脊柱畸形，在輕微外力作用下便會發生骨折，或因胸廓畸形使肺活量減少，影響心肺功能。

隨著生活水準的提高和人口老齡化社會的到來，骨質疏鬆症的防治已成為一個迫切問題。因此，對於從中藥開發出用於預防和治療骨質疏鬆症的一種安全、有效、使用的方便的現代中成藥劑型，以達提高老年人及停經後婦人的生活質量，便具有一定的需求性。

依先前技術而言，用於治療骨質疏鬆症的藥物主要有三類。第一類是抑制骨吸收，主要有雌激素、降鈣素、二磷酸鹽、異丙氧黃酮、鈣劑；第二類是促進骨形成的藥



五、發明說明(2)

物，主要有活性維生素D、氟化物、合成類固醇、甲旁素(PTH)；此兩者的功效都是終止骨量的進一步丟失，並使骨量有一定程度的增加。不過，上述兩類都因為副作用較多，或長期使用會引起併發症，或價格昂貴，或療效不確切等缺點，均非治療骨質疏鬆症的理想藥物。

用於治療骨質疏鬆症藥物的第三類是基於中藥"腎主骨"理論。根據中醫腎主骨理論，認為骨質疏鬆症與中醫腎虛的關係非常密切。腎虛骨痛為其主要症狀，表現有腰背疼痛，脛膝酸軟等，這些症狀也恰是骨質疏鬆症的主要症狀。因此，治療骨質疏鬆症，必須以補腎為主要治療原則。中藥防治骨質疏鬆症的機制可能是通過對機體的全身性、多環節、多通路的調節作用來實現的。

現代醫學也發現，雌激素水平的高低與腎陰陽平衡有一定關係。通過補腎療法可以糾正免疫系統功能低下，恢復下丘腦---垂體---目標器官(target organ)的功能活動，促進骨鈣的沈積，同時具有抑制骨吸收和加快骨形成的作用，不但可以延緩骨量丟失，甚至可以增加骨量。

在先前技術中，蛇床子(Fructus cnidii)?傘形科植物蛇床Cnidium monnieri (L.) Cuss.的乾燥成熟果實，屬果實中藥材，所含有效化學成分係為香豆素類中的蛇床子素(osthole)和歐前胡內酯(imperatorin)。而蛇床子在



五、發明說明 (3)

中醫藥理學上有補腎壯陽的作用，另外也可預防停經後婦人的骨質疏鬆症，實驗證明蛇床子及其總香豆素對去卵巢大鼠的骨質疏鬆和類固醇性大鼠的骨質疏鬆有明顯預防作用；其主要活性成分蛇床子素可通過抑制骨吸收和骨形成，阻止去卵巢後的骨質轉換，防止骨質流失，保持骨量的正常水平。

近年來以含有蛇床子的複方製劑用於臨床的報告很多，但主要是在婦科病及皮膚病等方面的應用。

不過，先前技術中由於中醫對骨質疏鬆症的辨證施治的分型較多，湯劑較多使其服用不方便，成藥的劑型也很落後等缺點，使其應用受到了一定的限制。

三、【發明內容】

有鑑於先前技術中存有副作用多、併發症的引發、價格昂貴、或劑型不方便等缺點，如果有一個毒副作用小、療效確切及服用方便、可以長期服用的產品，那麼該產品在現有骨質疏鬆症藥物市場中就能佔有一席之地，而產生巨大的經濟效益。

蛇床子的總香豆精小鼠口服急性半致死劑量LD50為 $2.44 \pm 0.05\text{g/kg}$ (見中華本草第五冊，931頁，大陸國家



五、發明說明 (4)

中醫藥管理局出版, 1999年5月), 因為毒性可能危害生命, 因此蛇床子用於治療時, 必須作精密的劑量控制。

本發明的目的是要提供一種用於骨質疏鬆症的醫藥組合物及方法, 此醫藥組合物係由一種中草藥材料搭配蛇床子的組合物, 此中草藥材料可降低蛇床子的毒性, 但不致影響蛇床子對於骨質疏鬆症的療效。

本發明的另一目的是提供一種由菟絲子搭配蛇床子的醫藥組合物及方法, 係具有預防及治療骨質疏鬆的療效。

本發明的醫藥組成物係由蛇床子、菟絲子2味中藥組成的混合物, 經由純化後, 而產生含高量有效成分(即香豆素類和黃酮類)的醫藥組合物, 其中所含的有效成分香豆素類和黃酮類已被世界公認是植物中具激素作用, 而成為當今骨質疏鬆藥研究的熱點之一。

本發明的菟絲子搭配蛇床子之醫藥組合物, 係具有明顯提高骨礦密度(Bone Mineral Density, BMD), 及明顯增加骨灰中的鈣、磷含量的功效。另外, 比起單獨使用有效成分蛇床子, 本發明醫藥組合物的口服毒性無安全顧慮。

四、【實施方式】



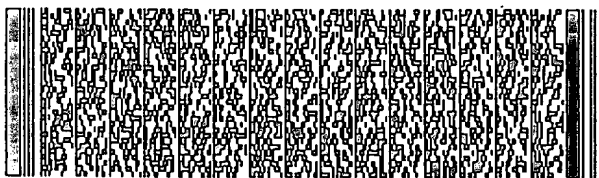
五、發明說明 (5)

依本發明的一實施例，此醫藥組合物係包含蛇床子和菟絲子兩味中藥，其中蛇床子和菟絲子的原藥材資源非常豐富，價格較便宜，有效成分含量較高，質量容易控制。

從發明人的研究中，菟絲子(*Semen cuscutae*)為旋花科植物菟絲子*Cuscuta chinensis* Lam. 乾燥成熟的種子，屬果實中藥材，所含有效化學成分係為黃酮類中的槲皮素(querletin)和山柰酚(Kaempferol)。而菟絲子在藥理學上有滋補肝腎的作用，治療黃體功能不足和調理女性生殖內分泌紊亂。所以，本發明使用菟絲子來搭配蛇床子，係考慮到中醫藥理上，骨質疏鬆症是與腎虛有關，菟絲子含的黃酮類有雌激素功能，有補腎的功效，而增進蛇床子的療效。

較佳實施例

取蛇床子粉末250g，菟絲子粉末150g於5L的容器內，並加入混合粉末4-10倍體積的20%-80%乙醇(或其他極性溶劑)，較佳實施例為2800ml的50%乙醇，加熱回流10小時，之後即冷卻過濾。接著，把濾液減壓濃縮至呈糊狀，再加入5%的賦型劑後(也可使用噴霧乾燥或冷凍乾燥)，乾燥粉碎即得粉末狀萃取物。



五、發明說明 (6)

在本發明進一步實施例中，基於上述實施例所得之粉末狀萃取物溶於適量的水中，倒入預處理好的D101大孔樹脂柱(聚苯乙烯非極性管柱)的頂端，依次用水(10 L)，10%乙醇(10 L)，和50%乙醇(10 L)沖洗，水洗脫物棄去，從醇洗脫物中，分別得蛇床子和菟絲子中有效成分的產物14.4g，9.6g。之後，把產物經過減壓濃縮後，得到含有有效成分的產物。

接下來，把此產物以高壓液相色譜儀(Agilent 1100)，以甲醇及水做為移動相進行分析，結果本發明醫藥組合物有效成分純度高達50%以上。

在上述的純化過程中，大孔樹脂係為一種除掉雜質、濃縮有效成分的一種純化精製方法，在其內進行洗脫，吸附其中的有效成分，再經洗脫回收，而分離出有效成分。

進一步地，適當的動物實驗顯示本發明的醫藥組合物能明顯地提高鼠腰椎骨的骨礦密度(Bone Mineral Density, BMD)，也能明顯增加股骨骨灰中的鈣、磷含量。

最重要的是，本發明的醫藥組合物經過動物模型的安全性測試，包括體內(in vivo)的毒性測試，發現並無口服急性半致死劑量LD50，因口服劑量達到2000mg/kg時，



五、發明說明 (7)

尚未達到它的最大值，也未有任何受試動物死亡。將動物處死，屍檢心、肝、脾、肺、腎、胃腸道等重要臟器，肉眼未見明顯異常變化。這顯示比起單獨使用有效成分蛇床子，本發明醫藥組合物的口服毒性無安全的顧慮。

為了測量本發明醫藥組合物在鼠體內(strain Sprague-Dawley)對於骨質疏鬆症狀的功效，將其濃度分為三種劑量，分別為100mg/kg、200mg/kg、400mg/kg，並與作為陽性控制組的骨疏康(中國東港市康晨製藥有限公司，其主要成分為淫羊藿、熟地黃、黃芪、丹參。中藥(95衛藥準字第Z-08號)比較。實驗選用三月齡雄性大鼠灌服維A酸(Retinoic Acid, RA)所致骨質疏鬆的動物模型。

依本發明的動物模型實驗，把64隻三月齡的雄性大鼠分成8組每組8隻。陰性對照組(亦即正常組)是給予0.5% CMC-Na溶液，而未給予維A酸的骨質健康大鼠。其他各組則是在實驗開始後15日內給予維A酸誘導骨質疏鬆大鼠，自實驗開始後每日藉由三種口服給藥：10ml/kg的病理模型組(0.5% 羧甲基纖維素鈉溶液(0.5% CMC-Na溶液))、3g/kg的陽性對照組(骨疏康)、及依體重給予100、200或400mg/kg的本發明醫藥組合物。每一隻的量也可由胃管協助給藥。連續五週後，測定每一隻老鼠腰椎骨和股骨中的骨礦密度及鈣、磷含量。



五：發明說明 (8)

骨礦密度的分析結果如表一。經過連續五週後，病理模型組與陰性對照組(骨質健康)比較，發現大鼠的腰椎與股骨骨礦密度明顯降低。在治療效果方面，本發明醫藥組合物在連續給藥五週後，200mg/kg、400mg/kg劑量組與病理模型組比較，則明顯發現可提高腰椎骨的骨礦密度；另外對於提高股骨骨礦密度方面，本發明醫藥組合物也具明顯功效。

表一：本發明醫藥組合物對維A酸誘導骨質疏鬆大鼠的腰椎骨和股骨礦密度的影響(n=6, $\bar{x} \pm SD$)



五、發明說明 (9)

治療方式	劑量	腰椎 (g/cm ²)	股骨 (g/cm ²)
陰性對照組 (骨質健康， 注射 0.5% CMC -Na 溶液)	10 ml/kg	0.315±0.050*	0.459±0.070*
病理模型 (注射 0.5% CMC-Na 溶 液)	10 ml/kg	0.258±0.018	0.376±0.027
本發明醫藥 組合物	100 mg/kg	0.274±0.029	0.408±0.015*
本發明醫藥 組合物	200 mg/kg	0.293±0.025*	0.408±0.024
本發明醫藥 組合物	400 mg/kg	0.280±0.006*	0.405±0.012*
陽性對照組 (骨疏康)	3000 mg/kg	0.285±0.031	0.429±0.034

* p<0.05 與病理模型組相比較

另外，骨礦含量的分析結果如表二。經過連續五週後，病理模型組與陰性對照組（骨質健康）比較，發現骨灰重係數（灰重／乾重）未見明顯變化，不過，骨灰中的鈣、磷含量均明顯降低。在治療功效方面，本發明醫藥組合物在連續給藥五週後，發現200mg/kg、400mg/kg劑量組明顯提高股骨骨灰中的鈣、磷含量。

表二：本發明醫藥組合物對維A酸誘導骨質疏松大鼠的股骨灰重係數及骨礦含量的影響

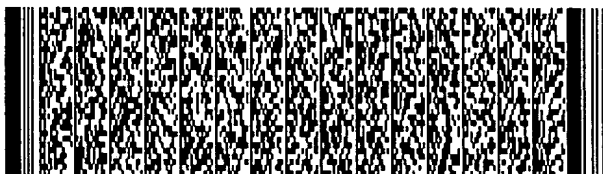


五、發明說明 (10)

治療方式	劑量	灰重系数 (g/g)	鈣含量 (g/g)	磷含量 (g/g)
陰性對照組 (骨質健康， 注射 0.5% CMC-Na 溶液)	10 ml/kg	0.588±0.068	0.142±0.011*	0.125±0.013*
病理模型 (注射 0.5% CMC-Na 溶 液)	10 ml/kg	0.568±0.020	0.129±0.008	0.112±0.005
本發明醫藥 組合物	100 mg/kg	0.576±0.020	0.129±0.031	0.116±0.026
本發明醫藥 組合物	200 mg/kg	0.576±0.014	0.150±0.010*	0.133±0.008***
本發明醫藥 組合物	400 mg/kg	0.594±0.059	0.151±0.013**	0.133±0.013***
陽性對照組 (骨疏康)	3000 mg/kg	0.574±0.015	0.148±0.010**	0.128±0.012**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 與病理模型組相比

關於本發明醫藥組合物的口服急性毒性試驗，選用20隻昆明種小鼠，雌雄各半。禁食12小時後灌服此醫藥組合物0.8ml/20g（最大給藥容量）後，觀察14日內老鼠的活動行為，之後並解剖分析內臟情況。結果顯示，灌服後活動減少，而2個小時後即恢復正常活動；另外，解剖發現心、肝、脾、肺、腎、胃腸道等重要器官，肉眼未見異常變化。經實驗結果顯示，本發明醫藥組合物口服劑量為2000mg/kg時尚未達到它的最大值。因此可以推論小鼠的



五、發明說明 (11)

最大耐受量大於2000mg/kg。

因此，在上述骨質疏鬆症的動物模型中，本發明醫藥組合物具有提高骨礦密度、增加骨灰中的鈣、磷含量，以及毒性低的特性。本發明醫藥組合物因此具有骨質疏鬆症的醫療功效。

在醫藥組合物中的蛇床子，較佳的比例為20至80重量%，最好是30至70重量%；而菟絲子的較佳比例為20至80重量%，最好是30至70重量%。在本發明中的醫藥組合物也可另外添加賦形劑、載體、穩定劑等，其數量按照業界常用即可。

雖然本發明以具體實施例描述如上，但該描述只是應用本發明的一個範例，並不能用來做為限制條件。任何改造、省略或組合，都將包含於本發明之中，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



圖式簡單說明

五、【圖式簡單說明】

無

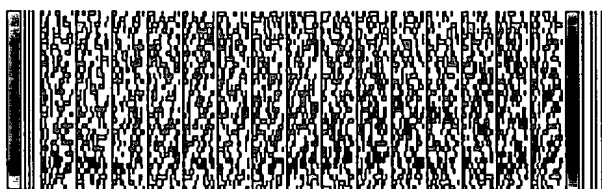
圖示元件符號說明

無



六、申請專利範圍

1. 一種用於預防及治療骨質疏鬆症的醫藥組合物，其中包含一蛇床子和一菟絲子混合液之一萃取物，以及一或多種以上藥理學上可接受的佐劑、載體及/或賦型劑。
2. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該萃取物係由蛇床子和菟絲子混合液，經乙醇或其他極性溶劑萃取及過濾後，經濃縮成粉末狀萃取物。
3. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中蛇床子的比例係為20至80重量%。
4. 如前述申請專利範圍第3項所述之醫藥組合物，其中蛇床子的比例較佳係為30至70重量%。
5. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中菟絲子的比例係為20至80重量%。
6. 如前述申請專利範圍第5項所述之醫藥組合物，其中菟絲子的比例較佳係為30至70重量%。
7. 一種用於骨質疏鬆症的醫藥組合物之製備方法，係包含：
 - (a) 將第一定量之蛇床子粉末與第二定量之菟絲子粉末混合；

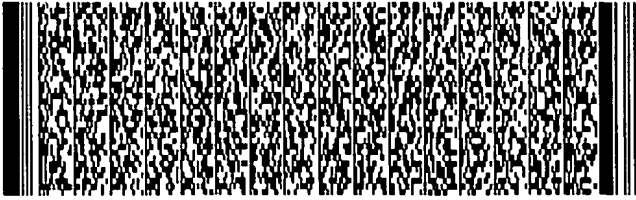


六、申請專利範圍

- (b) 加入20% -80% 的乙醇加熱回流後；
- (c) 冷卻過濾；
- (d) 乾燥、粉碎後取得一萃取物；
- (e) 將該萃取物溶於水中後，倒入預處理好的大孔樹脂柱內；
- (f) 依次於大孔樹脂柱內加入水與乙醇不同比例溶液進行解吸，以獲得用於骨質疏鬆症之醫藥組合物。



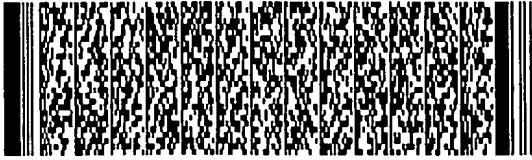
第 1/18 頁



第 2/18 頁



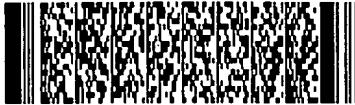
第 3/18 頁



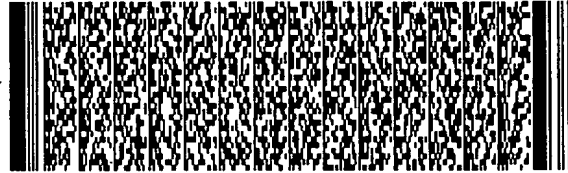
第 3/18 頁



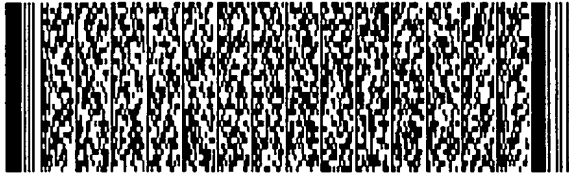
第 4/18 頁



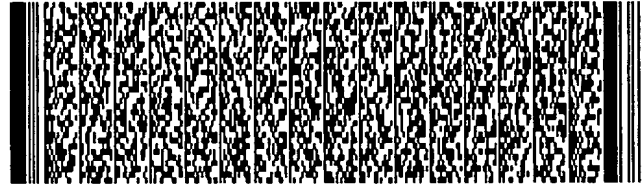
第 5/18 頁



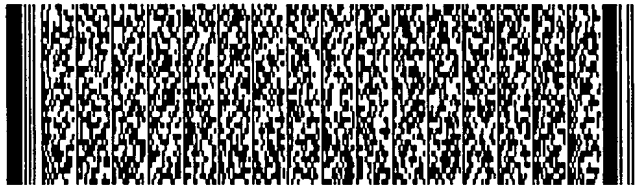
第 5/18 頁



第 6/18 頁



第 6/18 頁



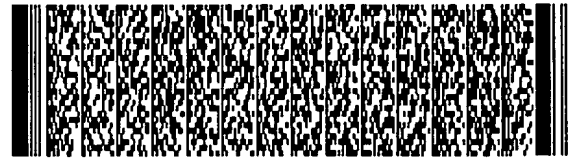
第 7/18 頁



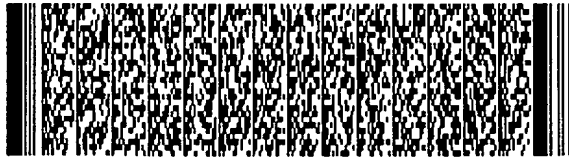
第 7/18 頁



第 8/18 頁



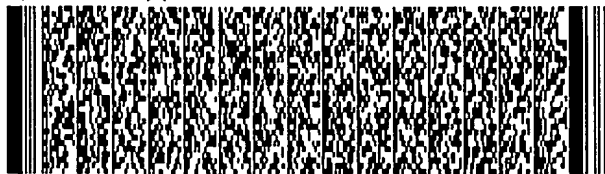
第 8/18 頁



第 9/18 頁



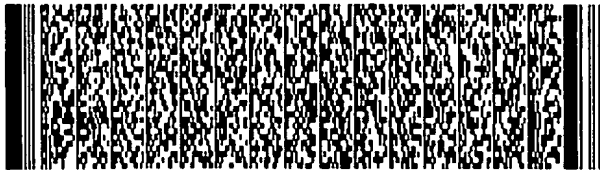
第 9/18 頁



第 10/18 頁



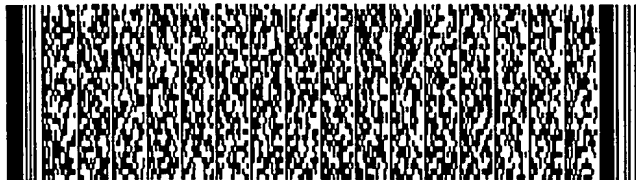
第 10/18 頁



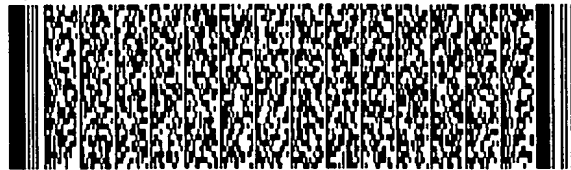
第 11/18 頁



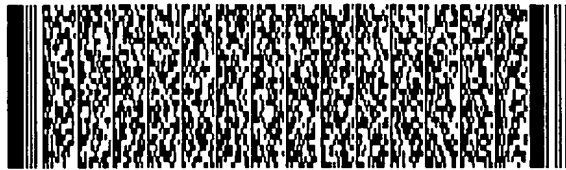
第 11/18 頁



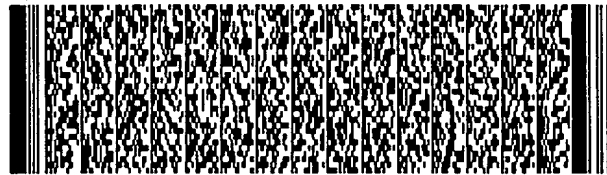
第 12/18 頁



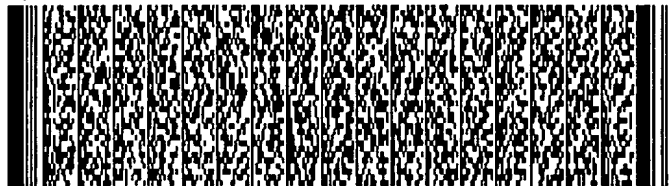
第 13/18 頁



第 14/18 頁



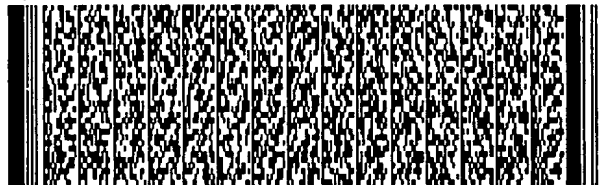
第 15/18 頁



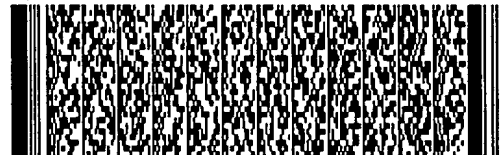
第 16/18 頁



第 17/18 頁



第 18/18 頁



中文造字申請單

專利名稱：用於預防及治療骨質疏鬆症之醫藥組合物與製備方法

中文字型	所使用欄位
芪	發明說明/P11L10C18